Über den Einfluss der gebräuchlichen Konservierungs- und Fixationsmethoden auf die Grössenverhältnisse tierischer Zellen.

INAUGURAL-DISSERTATION

WELCHE

ZUR ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

IN DER

MEDICIN UND CHIRURGIE

MIT ZUSTIMMUNG

DER MEDICINISCHEN FACULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

AM 21. MÄRZ 1893

NEBST DEN ANGEFÜGTEN THESEN

ÖFFENTLICH VERTEIDIGEN WIRD

DER VERFASSER

Richard Germer

aus Schloppe (Westpreussen).

OPPONENTEN: Hr. cand. med. Hugo Germer,
„ cand. med. Richard Soldan.
„ Dd. med. Karl Kaiserling.

BERLIN

C. VOGT's BUCHDRUCKEREI (E. EBERING).

Linkstrasse 16.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535703_0058

Meinen Eltern gewidmet.

Da die feinere Analyse der histologischen Objekte nach Erledigung der makroskopischen Untersuchung auf das Mikroskop angewiesen ist, so ist es eine natürliche Folge in der Entwicklung der histologischen Methoden gewesen, dass die Aufschlüsse, welche auf diese Weise gewonnen wurden, wesentlich auf dem Gebiete der körperlichen Formen sich finden. Zwar sind von Alters her vielfache Versuche über die chemische Beschaffenheit der kleinen Komponenten jener Formen angestellt worden, sodass man wenigstens die wesentlichsten Gruppen der verschiedenen, in der Zusammensetzung vertretenen Körper (Eiweiss, Fett, Schleim etc.) trennen konnte.

Den beiden letzten Jahrzehnten gehören die Versuche an, durch elektive Färbungen chemisch zusammengehörige Körper hervorzuheben, beziehungsweise ungleichartige zu differenzieren, während in früherer Zeit die Färbungen lediglich in Rücksicht auf die Architektur der Teile zur Anwendung gelangten. Die grossen Schwierigkeiten, welche der Anpassung der Methoden der organischen Chemie an das mikroskopische Verfahren hindernd entgegenstehen, haben bisher immer

nur einen sehr spärlichen Einblick in die chemische Natur der Gewebe ermöglicht. So aussichtsreich auch der von vielen erfahrenen und berufenen Forschern betretene Weg unzweifelhaft ist, so muss es doch im höchsten Grade wünschenswert erscheinen, diesen Methoden andere an die Seite zu stellen, welche im Stande sind, weitere Gesichtspunkte zu gewinnen und neuere Erfahrungen zu verheissen.

Wenn es als das Endziel der naturwissenschaftlichen Forschung anzusehen ist, die vitalen Vorgänge auf mechanischem Wege zu erklären, so muss als ein näheres Ziel das Verständnis der körperlichen Formen auf Grund physikalisch-chemischer Erfahrungen erstrebt werden. Dass hierbei eine Berücksichtigung der Methoden derMathematik, dieser exaktesten Wissenschaft, erwünscht ist, dürfte wohl nicht zweifelhaft erscheinen, wenn man bedenkt, wie wenig sich bis jetzt die Biologie die Fortschritte der höheren Mathematik besonders in der analytischen Geometrie zu Nutze gemacht hat. Ist auf dem Gebiete der organischen Chemie auch noch sehr wenig bis jetzt erreicht, und fehlen namentlich noch die Grundlagen, von denen ein erfolgreicher Fortschritt gerade auf mikroskopischem Felde zu erwarten ist, so ist die Notwendigkeit um so grösser, an allen angreifbaren Punkten mit allen zur Verfügung stehenden Mitteln vorzugehen.

Wenn man im allgemeinen die chemische Beschaffenheit der mikroskopischen Objekte aus den Veränderungen der vorhandenen Elemente durch chemische Mittel zu ergründen suchte, so dürfte eine sehr umfang-

reiche Erweiterung der mikrochemischen Methoden und Erfahrungen dadurch möglich sein, dass man nicht auf das Gesamtgebilde, sondern auf einzelne Teile nach Entfernung der anderen die verfügbaren Methoden zur Anwendung brächte. Indem durch geeignete Lösungsmittel gewisse Teile aus dem geweblichen Zusammenhange gelöst würden, so könnte der unlöslich zurückbleibende Rest für das Verständnis der physikalisch-chemischen Verhältnisse einen nicht zu unterschätzenden Rückschluss erlauben. Ich berufe mich hier auf die bekannte Thatsache, dass die Chromsalze je nach der Mitwirkung oder der Ausschliessung des Lichts auf Körpergewebe einen durchaus differenten Einfluss üben, insofern sie in dem einen Falle mehr, in dem anderen weniger härtend wirken. Dies findet seine Erklärung darin, dass das eine Mal ein grösserer, unter der anderen Bedingung dagegen ein geringerer Teil der Bestandteile fixiert wird. Dieser Umstand findet eine Parallele in der Einwirkung der Chromsalze auf Gelatine beim Lichtdruckverfahren. Unter dem Einflusse des Lichts gehen die Chromsalze mit der Gelatine eine feste Verbindung ein, während an den nicht belichteten Stellen die Gelatine leicht durch warmes Wasser zu entfernen ist. Gelänge es nun histologische Objekte auf diese oder ähnliche Weise in lösliche und unlösliche Substanzen zu scheiden, so würde diese Trennung weitere wichtige Einblicke in Strukturverhältnisse der Elementarteile gewähren, welche der rein morphologischen Betrachtung nicht zugänglich wären.

Bisher haben allerdings Versuche in dieser Richtung erst spärliche Erfolge aufzuweisen.

Ferner würden Untersuchungen bezüglich der Lichtbrechungsdifferenzen als wertvolle Ergänzung für die mittelst des Spektroskops und Polariskops in Verbindung mit dem Mikroskop gewonnenen spärlichen Erfahrungen zu erstreben sein. Leider hat sich bei vielen Versuchen herausgestellt, dass den refractometrischen Methoden auf dem mikroskopischen Gebiete bisher unüberbrückbare Schwierigkeiten durch die Kleinheit der Objekte und die unzureichende Lichtstärke entgegenstehen. Ich beziehe mich hier auf eine private Mitteilung des Hrn. Dr. Israël, der sich um die Ausbildung dieser Methoden vorläufig allerdings ohne Erfolg bemüht hat.

Eine andere Frage ist aber, ob die Untersuchungsmethoden, soweit sie bisher im Gebrauch sind, nicht durch Vervollkommnung und grössere Exaktheit erfolgreicher angewandt werden könnten. Thatsächlich steht die einfachste physikalische Ermittlung, die Bestimmung der Grössenverhältnisse histologischer Objekte, noch nicht auf so exakter Grundlage, wie sie für Messungen in den übrigen Gebieten der Naturwissenschaften geschaffen ist. Darum erscheint es nicht verwunderlich, dass ihre Resultate nur zu gewissen Vergleichen, aber noch nicht in der Weise verwandt worden sind, dass aus ihnen Schlüsse bezüglich des inneren Aufbaues der histologischen Objekte gezogen werden können. Wenn konstante Differenzen sich finden liessen, welche durch Einwirkung bestimmter Chemikalien auf die Grössenverhältnisse von Zellen stattfänden, so kann aus der

Grössenveränderung ein Schluss auf die chemische Konstitution gezogen werden.

Von Hrn. Privatdocenten Dr. O. Israël wurden Kollege Kaiserling und ich gerade auf diese Seite des Gegenstandes gelenkt. Hrn. Dr. Israël bin ich sowohl für die Anregung zu dieser Arbeit, wie für sein Interesse, welches er meinen Bemühungen schenkte, zu grossem Danke verpflichtet. Gleichen Dank schulde ich Hrn. Geheimrat Rudolf Virchow für die gütige Ueberlassung des Arbeitsplatzes im pathologischen Institut.

Ist das Bisherige auch nur ein Anfang, so erscheint doch der Ausbau dieser Methode geeignet, Resultate zu ergeben, die über die physikalisch- chemische Natur der Zellen aufzuklären im Stande sind. Da sehr umfangreiche Erfahrungen, die erst allmälig und nach längerer Zeit zu einer zusammenhängenden Vorstellung führen können, gemacht werden müssen, um die Verwertbarkeit der Methode für allgemeinere Fragen zu ermitteln, so fassen die uns gestellten Aufgaben zunächst rein praktische Fragen ins Auge. Zu meiner Prüfung gelangten die gebräuchlichen Konservierungs- und Fixiationsmethoden. Massgebend war hierfür der Gesichtspunkt, dass der Mikroskopiker die Fehlerquellen, welchen er durch die Abhängigkeit von diesen unentbehrlichsten Hülfsmitteln täglich ausgesetzt ist, nur dann vermeiden kann, wenn er ihren Einfluss auf das genaueste kennt. Denn dass man bei der Wahl der Zusatzflüssigkeiten immer die Beschaffenheit des Untersuchungsobjektes in Betracht ziehe, ist schon darum ganz unumgänglich, weil man

sonst leicht die Resultate chemischer Umsetzungen und Verbindungen für von vorneherein vorhandene Zustände ansprechen könnte. Und die Grössenveränderungen unter dem Einfluss der verschiedenen Fixationsmethoden darf man nicht als nebensächliche Dinge ansehen, sondern man muss sie als Ausdruck feinerer chemischer und physikalischer Vorgänge würdigen.

Die Schwierigkeiten, welche zur Erreichung unseres Zieles zu überwinden waren, bestanden in der Wahl der Messmethode und geeigneter Untersuchungsobjekte für den Anfang. Die erstere Schwierigkeit in einer für unsere Arbeit befriedigenden Weise beseitigt zu haben, ist ein Verdienst meines Mitarbeiters. Die Messmethode musste uns erstens die grösstmögliche Genauigkeit gewährleisten, da es sich darum handelte, auch minimale Grössenunterschiede zu bestimmen, und zweitens musste sie uns ermöglichen, eine grosse Reihe von Beobachtungen hintereinander vorzunehmen, ohne dass wie bei dem gewöhnlichen Messverfahren mittelst des Okularmikrometers und Okularschraubenmikrometers leicht Ermüdung eintritt und damit Vergrösserung der subjektiven Fehler. Die letzte Forderung war schon darum unumgänglich, weil wir bei der für unsere Arbeit so wichtigen Untersuchung möglichst frischer Objekte genötigt waren, das immerhin schwierig zu beschaffende Material in kürzester Frist auszunutzen. In der Mikrophotographie bot sich das Mittel, das nicht nur die genannten Forderungen erfüllte, das also mit der grössten Genauigkeit die Schnelligkeit der Ausführung verband, sondern noch den erheblichen Vorteil brachte, dass die

Grössendifferenzen fixiert wurden, sodass ihre Zuverlässigkeit jederzeit und von Jedermann geprüft werden kann. Den letzten Punkt betone ich deshalb ausdrücklich, weil wir, wie ich später noch ausführlicher auseinandersetzen werde, die Präparate einer fortlaufenden Behandlung unterzogen und nur auf diese Weise die wechselnden Bilder festzuhalten vermochten.

Inbetreff der genaueren Details der Messung muss ich auf die Inaug. Dissert. von Kaiserling: „Die Mikrometrie und ihre Anwendung auf die Bestimmung der Grössenveränderungen der roten Blutkörperchen einzelner Vertebraten durch Zusatzflüssigkeiten" verweisen, und ich beschränke mich darauf, ganz in kurzem den Gang des Verfahrens zu schildern. Photographiert wurde mit dem grossen Zeissschen mikrophotographischen Apparat und Zeissschen apochromatischen Objektiven. Die Messungen wurden sämtlich auf den Negativen vorgenommen in der Weise, dass unter einem Lupenstativ bei ca. 5maliger Vergrösserung die Grösse der Objekte mit einem darüber gelegten, in halbe mm geteilten, durchsichtigen Massstabe verglichen wurde. Die 10tel mm wurden durch Schätzung ermittelt. Dass, um die Richtigkeit solcher Schätzungen zu verbürgen, grosse Uebung nötig ist, brauche ich wohl nicht zu betonen. Wenn irgendwo, dann gilt hier das alte Sprichwort, dass nur Uebung den Meister macht. Aber bei einiger Ausdauer erreicht man bald eine solche Sicherheit, dass die Schätzungen fast den Wert von sicheren Ermittlungen beanspruchen dürfen. Die Bestimmung der betreffenden Vergrösserung fand statt, indem ein in 100

Teile geteilter mm (ebenfalls von Carl Zeiss), dessen Intervalle auf der Normal-Aichungs-Kommission genau bestimmt waren, photographiert und auf dem Negativ ganz ebenso gemessen wurde.

Nicht geringere Schwierigkeiten bot die Auswahl geeigneter Untersuchungsobjekte. Wir bedurften zu unserem Zwecke Zellen, welche einer genauen Messung zugänglich waren. Zuerst versuchten wir es mit pflanzlichen Mikroorganismen. Aber nach zahlreichen Versuchen standen wir hiervon ab. Denn abgesehen von den Schwierigkeiten, die es macht, lebende bewegliche Bacillen zu photographieren, ist die Zellennatur der Bakterien noch so wenig aufgeklärt, dass die Bearbeitung gerade dieses Objekts uns vorläufig noch verfrüht erschien. Auch mit den Leberzellen, die wir sodann vornahmen, kamen wir nicht weiter. Gerade hierbei gingen uns die Schwierigkeiten auf, welche sich dem Beginnen entgegenstellen, organisierte Gebilde in mathematische Formeln zu zwängen. Die Leberzellen besitzen eben nicht die geraden sechseckigen Konturen, die ihnen in den meisten Lehrbüchern zugeschrieben werden. Besseres schon schienen uns die Cylinderepithelzellen an den Spitzen der Markkegel der Nieren zu versprechen. Aber wir standen einstweilen überhaupt von diesen schwierigeren Aufgaben ab, sie einer späteren Bearbeitung vorbehaltend. Die einfachsten Zellen, welche wir im tierischen Organismus zu finden vermochten, waren die roten Blutkörperchen der Vertebraten und die Ovula von Säugetieren. Das letztere Objekt fiel meiner Bearbeitung zu.

Das nötige Material bezog ich aus dem Centralschlachthof durch die gütige Vermittlung des Herrn Direktor Hertwig, dem ich für seine liebenswürdige Unterstützung an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank ausspreche. Zur Untersuchung kamen ausschliesslich Ovula von Kühen.

Die Präparation wurde in der Weise vorgenommen, dass zunächst die mit Liquor folliculi gefüllten Follikel aus dem Ovarium herauspräpariert und dann auf dem Objektträger mit einem spitzen Messer geöffnet wurden. In dem austretenden Liquor wurde dann das Ei mit schwachen Vergrösserungen gesucht, von dem herumsitzenden Follikelepithel möglichst befreit und in zugesetztem Liquor photographiert. Als Kriterium für eine Grössenveränderung kann natürlich immer nur der Vergleich mit dem frischen lebenden Objekt dienen. Der Druck des Deckglases wurde durch zwischengelegte Kopfhaare vermieden. Die benutzten Objektträger hatten sämtlich die gleiche Dicke (1,2 mm), ebenso die Deckgläschen (0,08 mm). Ueber die Aenderung der Vergrösserung durch verschiedene Dicke der Objektträger verweise ich auf die bereits genannte Innaug. Dissert. von Kaiserling. Da in der Vergrösserung von Tag zu Tag, ja häufig von Stunde zu Stunde durch Einflüsse, welche ich nicht genauer zu analysieren vermag, Aenderungen eintraten, so wurde der in 100 Teile geteilte mm nicht einmal sondern 2—3 mal während der Aufnahme einer Serie photographiert. Die Aenderungen betrafen nur die Stellungen hinter dem Komma: 120,2; 120,4; 120,5.

Die Grösse der einem Ovarium entnommenen Ovula ist eine so wechselnde, dass es nötig war, immer ein und dasselbe Ei erst frisch, dann in dem betreffenden zu untersuchenden Reagens zu messen. Der Vorwurf, dass eine genaue Ermittlung des Einflusses der Reagentien an dem Fehlen einer Konstante scheitern müsse, ist wenigstens in Bezug auf diesen Teil der Arbeit durch nichts begründet.

Der Gang der Untersuchung war nun folgender:

1. Untersuchung eines Eies in Liquor folliculi.
2. Untersuchung desselben Eies in physiologischer Kochsalzlösung, welche durch die bekannte Durchsaugemethode zur Einwirkung gelangte.
3. Untersuchung desselben Eies in dem betreffenden Fixationsmittel.

Der Grund dafür, dass ich die Fixationsmittel nicht direkt auf das Ei in dem Liquor folliculi einwirken liess, lag darin, dass die zum Teil eiweisskoagulierenden Fixationsmittel in dem eiweissreichen Liquor einen dicken Niederschlag hervorriefen. Dies konnte ohne Nachteil für meine Ergebnisse geschehen, weil ja vorher genau der Einfluss der physiologischen Kochsalzlösung zahlenmässig bestimmt war.

Die Dauer der Einwirkung der Reagentien betrug durchschnittlich 15 Minuten. Die Einwirkung wurde unter dem Mikroskop kontroliert. Gemessen wurden auf dem Negativ an jedem Ei vier Durchmesser, welche gegeneinander um 45° geneigt waren. Die Aufzeichnung dieser Durchmesser auf durchsichtigem Oelpapier, welches auf dem Präparierstativ unter das zu

messende Negativ gelegt wurde, ermöglichte es, den in halbe mm geteilten Massstab immer entsprechend diesen Durchmessern anzulegen. Selbstverständlich muss man sich bei diesen Messungen vergegenwärtigen, dass man Flächen misst, während es sich in Wirklichkeit um körperliche Gegenstände handelt. Dass man die Eier als Kugeln auffasst, scheint mir das Natürlichste. Trotzdem bin ich mir hierbei bewusst, dass ich etwas supponiere, wofür ich den strikten Beweis nicht erbringen kann.

Weitere Fehlerquellen, welche bei der angewandten Methode in Betracht kommen könnten, sind Druck des Deckglases und infolge dessen Quetschung des Präparats; ferner eine Beeinträchtigung der Einwirkung der Reagentien durch das dem Ei aufsitzende Follikelepithel. Die erste Fehlerquelle ist leicht auszuschliessen. Ein Blick auf die Negative zeigt, ob eine Quetschung stattgefunden hat. Ich bemerke zudem, dass die zwischengelegten Haare ziemlich sicher eine solche Quetschung verhindern. So sind bei der grossen Zahl der Versuche höchstens 2—3 Präparate auf diese Weise unbrauchbar geworden. Schon schwieriger verhält es sich mit dem zweiten möglichen Fehler. Doch glaube ich, bestärkt durch Kontrolversuche an völlig isolierten Eiern, diesen Einfluss nicht zu hoch anschlagen zu dürfen.

Es handelte sich nun zunächst darum, festzustellen, ob die allgemein als indifferent geltenden Mittel wirklich das leisten, was man von ihnen erwartet, ob sie also in diesem speziellen Falle den Liquor folliculi zu er-

setzen vermögen. Ich betrachte zunächst die physiologische Kochsalzlösung.

Schon dieser Name vindiciert für diese Flüssigkeit, dass sie sich indifferent verhält gegen tierische Gewebe. Die Annahme, dass ein und dieselbe Flüssigkeit sich gegen die untereinander chemisch wie morphologisch so verschiedenen histologischen Objekte indifferent verhalten soll, muss doch von vornherein befremdlich erscheinen. Zur Verwendung kam die Kochsalzlösung als 0,6 pCt. und 0,75 pCt. Ich muss mich selbstverständlich darauf beschränken, aus der grossen Zahl meiner Versuche einige wenige als Beispiel anzuführen.

1. Durchmessser in Liquor folliculi; in 0,6 pCt. NaCllösung. Apochr. 16 mm. — Proj. oc. 4.

aa.	0,1597 mm.	0,1722 mm.
bb.	0,1602 „	0,1722 „
cc.	0,1597 „	0,1734 „
dd.	0,1597 „	0,1743 „
Summa	= 0,6393.	0,6921.

Mittlerer Durchmesser: 0,1598 mm., 0,173 mm.

Für das Volumen der Eier, welche ich als Kugeln betrachte, erhalte ich nach der bekannten Formel $4/3\ R^3\ \pi$ folgende Werte:

Vol. des Eies in Liquor folliculi = 0,0021367 ccmm.
Vol. des Eies in 0,6 pCt. NaCllös. = 0,0026644 „

Mit der Auffassung des Eies als Kugel kann ich mich übrigens auf das Urteil von Waldeyer berufen, der das Ei „als eine wenn auch nicht ganz regelmässige Kugel“ betrachtet.

Die Zunahme des Eies in physiologischer Kochsalzlösung beträgt demnach: 0,0005277 ccmm. Diese Zunahme ist nicht etwa gering anzuschlagen. Man muss bedenken, dass der Wert in ccmm angegeben ist. Drücke ich die Zunahme in μ ($1\mu = 1/1000$ mm) aus, dann erhalte ich den kolossalen Wert von 527700 μ 3.

2. Durchmesser in Liquor folliculi; in 0,6 pCt. NaCllösung.

aa.	0,1319 mm.	0,139 mm.
bb.	0,1328 „	0,1411 „
cc.	0,1328 „	0,139 „
dd.	0,1295 „	0,1369 „
Summa	= 0,5270.	0,5560.

Mittlerer Durchmesser = 0.13176 mm. 0.139 mm.
Volumen des frischen Eies = 0,0011975 ccmm.
Vol. des Eies in 0.6 pCt. NaCllösung = 0,001406 ccmm.
Zunahme in 0,6 pCt. Kochsalzlösung = 0,000209 ccmm.

3. Durchmesser in Liquor foll.; in 0,75 pCt. NaCllösung.

aa.	0,1414 mm.	0,1457 mm.
bb.	0,1331 „	0,1393 „
cc.	0,1373 „	0,1414 „
dd.	0,1373 „	0,1435 „
Summa	= 0,5491.	0,5699.

Mittlerer Durchmesser = 0,1372 mm. 0,1424 mm.
Vol. in Liquor follic. = 0,0013522 ccmm.
Vol. in 0,75 pCt. NaCllös. = 0,001512 „
Zunahme in 0,75 pCt. NaCllösung = 0.00016 ccmm.

Ob die durch alle Versuche durchgehende Vergrösserung in physiologischer Kochsalzlösung auf einer mechanischen Aufschwemmung beruht, darüber kann ich mich nur Mutmassungen hingeben. Jedenfalls hat diese Annahme viel Wahrscheinlichkeit, wenn man den etwas

visciden, stark paralbuminhaltigen Liquor folliculi mit der wässrigen Beschaffenheit der Kochsalzlösung vergleicht.

Dass die Grössenveränderungen nicht immer in ganz gleichem Masse stattfinden, kann eigentlich nur bei dem Befremden erregen, der in schematischer Weise sämtliche Zellen als gleichwertig betrachtet. In Wirklichkeit aber ist doch jede Eizelle von der anderen verschieden, die eine ist vielleicht reifer, die andere noch in jugendlicherem Zustande, die eine reicher an Protoplasma, die andere an Deuteroplasma. Es liegt mir nichts daran, mit bestimmten einfachen Zahlen aufzutreten und vielleicht zu behaupten, die Eizellen nehmen um so und so viel Procent in Kochsalzlösung zu, sondern ich konstatiere an einzelnen Zellen die Grössenzunahme, hüte mich aber wohl, den Wert dieser Grössenzunahme als konstant und feststehend hinzustellen.

Das von Max Schultze (Virch. Arch. Bd. 30. 1886) in die Technik eingeführte Jodserum geniesst als indifferente Zusatzflüssigkeit einen grossen Ruf, wenngleich die Anwendung hinter der der physiologischen Kochsalzlösung mehr in den Hintergrund getreten ist. Sie soll nach Angabe ihres Entdeckers auch die Integrität der zartesten Zellen nicht stören und die Form der Elementarteile auch nach längerer Maceration erhalten. Da natürliches Amnionwasser mir nicht zur Verfügung stand, erprobte ich das künstliche nach der

Angabe von Max Schultze. (Eiereiweiss 30,0
Aq. dest. 270
Natr. chlor. 2,5)

Ich machte mit dieser Flüssigkeit aber sehr bald die Erfahrung, dass die zugesetzte Jodlösung keineswegs das Wuchern von zahllosen Kokken und Bacillen verhindert, ein Umstand, der die Indifferenz dieses Mittels wohl sehr in Frage stellt. Wenn zudem M. Schultze die Indifferenz und zugleich die Macerationsfähigkeit als Vorzüge seiner Zusatzflüssigkeit hervorhebt, so ist mir wenigstens wunderbar, wie ein Mittel beide Vorzüge in sich vereinigen kann. Versuche mit natürlichem Jodserum werde ich anstellen, sobald es mir zur Verfügung steht.

Die Flemmingsche Lösung kam in zwei Modifikationen zur Verwendung.

1. (nach Angabe von Flemming: die Zelle).
   Chromsäure 0,25 pCt.
   Osmiumsäure 0,1 „ (in H 2 0)
   Eisessig 0,1 „
2. Chromsäure 1 pCt. 25 ccm.
   Osmiumsäure 1 „ 10 „
   Essigsäure 1 „ 10 „
   Aq. dest. 55,0.

1 Durchmesser	in NaCllös.	in Flemm. Lös.
aa.	0,1768 mm.	0,183 mm.
bb.	0,1747 „	0,1809 „
cc.	0,1747 „	0,1809 „
dd.	0,1747 „	0,183 „
Summa =	0,7009.	0,7278.

Mittlerer Durchm. = 0,1752 mm. 0,1819 mm.
Vol. des Eies in physiolog. Kochsalzlösung = 0,0028157 ccmm
Vol. des Eies in Flemmingscher Lösung = 0,0031519 „
Zunahme in Flemmingscher Lösung = 0,0003362 „

2. Durchm. in NaCllösung.; in Flemm. Lösung

aa.	0,1622 mm.	0,1747 mm.
bb.	0,1581 „	0,1726 „
cc.	0,1582 „	0,1664 „
dd.	0,1582 „	0,1714 „
Summa	= 0,6367.	0,6851.

Mittlerer Durchm. = 0,1592 mm. 0,1713 mm.
Vol. in NaCllösung = 0,0021126 ccmm.
Vol. in Flemm. Lösung = 0,0026272 „
Volumenzunahme = 0,0005146 ccmm.

3. Durchm. in NaCllösung; in Flemm. Lös.

aa.	0,1368 mm.	0,1492 mm.
bb.	0,1347 „	0,1567 „
cc.	0,1347 „	0,1534 „
dd.	0,1368 „	0,1534 „
Summa	= 0,5430.	0,6127.

Mittlerer Durchmesser = 0,1357 mm. 0,1532 mm.
Vol. in NaCllösung = 0,001305 ccmm.
Vol. in Flemm. Lös. = 0,0018827 „
Volumenzunahme in Flemm. Lös. = 0,0005772 ccmm.

Welchem Bestandteil der Flemmingschen Lösung die Quellung zuzuschreiben ist, lasse ich dahingestellt. Die Fixierung mit dem Flemmingschen Chromosmium-essigsäuregemisch leistet übrigens für Eizellen nicht das, was man von einem guten Fixationsmittel erwartet. Die Eier verlieren meist ihre scharfen Konturen, sodass gerade diese Messungen mit grossen Schwierigkeiten

verknüpft waren. Zudem wird in die Gewebselemente eine neue Strukturanordnung hineingebracht, die man an dem frischen Objekte vergeblich suchen würde. Kultschitzky (Zeitschrift für wissenschaftl. Mikroskopie 1887) möchte diese Wirkung der Chromsäure zuschieben. Viel bessere Resultate giebt die Fixierung in Osmiumsäure. Ich benutzte eine 1 procentige Lösung.

1. Durchm. in NaCllösung; in Osmiumsäure.

aa.	0,1726 mm.	0,1747 mm.
bb.	0,1705 „	0,1705 „
cc.	0,1705 „	0,1714 „
dd.	0,1714 „	0,1714 „
Summa	= 0,6850.	0,6880.

Mittlerer Durchm. = 0,17125 mm. 0,172 mm.
Vol. in NaCllösung = 0,0026272 ccmm.
Vol. in Osmiumsäure = 0,0026644 „
Zunahme in Osmiumsäure = 0,0000372 ccmm.

2. Durchm. in NaCllösung; in Osmiumsäure.

aa.	0,1393 mm.	0,1414 mm.
bb.	0,1393 „	0,1414 „
cc.	0,1381 „	0,1414 „
dd.	0,1414 „	0,1423 „
Summa	= 0,5581 „	0,5665 „

Mittlerer Durchm. = 0,1395 mm. 0,1416 mm.
Vol. in physiolog. Kochsalzlösung = 0,0014183 ccmm.
Vol. in Osmiumsäure 1 pCt. = 0,0014865 „
Zunahme in Osmiumsäure = 0,0000682 ccmm.

3. Durchm. in NaCllösung; in Osmiumsäure.

aa.	0,1492 mm.	0,1617 mm.
bb.	0,1492 „	0,1592 „
cc.	0,1492 „	0,1617 „
dd.	0,1492 „	0,1617 „
Summa	= 0,5968.	0,6443.

Mittlerer Durchm. = 0,1492 mm. 0,161 mm.
Vol. in physiologischer Kochsalzlösung = 0,001739 ccmm.
Vol. in Osmiumsäure = 0,002182 „
Zunahme in Osmiumsäure = 0,000443 ccmm.

Die Osmiumsäure ist überhaupt als Fixationsmittel für zarte Objekte wie Eizellen am meisten geeignet und zu empfehlen. Neben geringfügigeren Grösseveränderungen bleiben die Formen und Konturen mit grosser Schärfe erhalten. Ausserdem ist die schnelle Wirkung, welche an der Schwärzung der Dotterkugeln leicht zu kontrollieren ist, ein nicht zu unterschätzender Vorteil. Da ferner die Osmiumsäure nicht mit dem Eiweiss der Zellen gewebeähnliche Niederschläge bildet, so entspricht auch die innere Strukturanordnung am meisten der der frischen Objekte.

Die Pikrinsäure in gesättigter wässriger Lösung ist für zarte Zellen überhaupt nicht zu brauchen. Die äussere Form wird durch ihre Anwendung stets zerstört. Besser erhält die Kleinenbergsche Pikrinschwefelsäure Form und Konturen, obgleich mir über ihre Wirkung nur geringe Erfahrungen zustehen.

Zusammensetzung der Kleinenbergschen Pikrinschwefelsäure:

acidi picronitr. (gesättigte wässrige Lösung) 50 ccm.
acidi sulfur. 1,0 „
Das Filtrat wird verdünnt mit aq. dest. 150 „

	Durchm. in NaClLösung;	in Pikrinschwefelsäure.
aa.	0,1447 mm.	0,1457 mm.
bb.	0,1435 „	0,1457 „
cc.	0,1447 „	0,1457 „
dd.	0,1457 „	0,1447 „
Summa	= 0,5786.	0,5818 „

Mittlerer Durchm. = 0,1446 mm. 0,1454 mm.
Vol. in physiolog. Kochsalzlösung = 0,0015381 ccmm.
Vol. in Pikrinschwefelsäure = 0,0016094 „
Zunahme = 0,0000263 ccmm

Interessant ist, dass die Pikrinschwefelsäure auf das Ei als solches eine wenn auch geringe Quellung hervorbringt, auf die Zona pellucida dagegen stark schrumpfend wirkt.

Durchm.	in NaCllös. (mit der Zona gem.);	in Pikrinschwefels. (ebenf. mit der Zona gem.).
aa.	0,1614 mm.	0,1547 mm.
bb.	0,1622 „	0,1547 „
cc.	0,1631 „	0,1547 „
dd.	0,1639 „	0,1547 „
Summa	= 0,6506.	0,6188.

Mittlerer Durchmesser = 0,1626 mm. 0,1547 mm.

Der Inhalt der Zona in NaCllösung ist $= {}^4/_3\ R^3\pi - {}^4/_3\ \varrho^3\pi =$ 0,0006678 cc mm

Der Inhalt der Zona in Pikrinschwefels $= {}^4/_3\ R_1{}^3\pi - {}^4/_3\ \varrho_1{}^3\pi =$ 0,0003254 „

Schrumpfung der Zona = 0,0003424 ccmm.

Sublimat wandte ich in zwei Form an:

1. als gesättigte Lösung nach Heidenhain.
2. in Form der Hayemschen Flüssigkeit.

Hydrargyr. bichlor. corros.	0,5
Natr. sulfur.	5,0
Natr. chlorati	2,0
Aq. dest.	200,0

1. Durchm.	in NaCllösung;	in Sublimat gesättigter Lösung;
aa.	0,1672 mm.	0,1547 mm.
bb.	0,1685 „	0,1581 „
cc.	0,1680 „	—
dd.	0,1680 „	0,1539
Summa	= 0,6717.	0,4667.

Mittlerer Durchm. = 0,1679 mm. 0,1556 mm.
Vol. in Na Cllösung = 0,0024783 ccmm.
Vol. in Sublimat-Lös. = 0,0019725 „
Differenz = 0,0005058 „

2. Durchm.	in NaCllösung;	in Sublimat ges. Lös.
aa.	0,1893 mm.	0,1664 mm.
bb.	0,1893 „	0,1664 „
cc.	0,1913 „	0,1664 „
dd.	0,1872 „	0,1664 „

Mittlerer Durchm. = 0,1893 mm. 0,1664 mm.
Vol. in NaCllösung = 0,0035462 ccmm.
Vol. in Sublimat-Lös. = 0,0024124 „
Differenz = 0.0011338 „

3. Durchm.	in NaCllösung;	in Sublimat.
aa.	0,1643 mm.	0,1447 mm.
bb.	0,1664 „	0,1457 „
cc.	0,1622 „	0,1457 „
dd.	0,1664 „	0,1457 „
Summa	= 0,6593.	0.5818.

Mittlerer Durchm. = 0,1648 mm. 0,1454 mm.
Vol. in NaCllösung = 0,0023436 ccmm.
Vol. in Sublimat = 0.0016094 „
Differenz = 0,0007342 ccmm.

Neben dieser starken Schrumpfung platzt an den Eizellen bei Anwendung dieser wohl zu stark wirkenden Lösung die Zona pellucida. Dies kehrt an den einzelnen Präparaten mit solcher Regelmässigkeit wieder, ss man an einen Zufall wohl kaum glauben kann. Viel besser erhält die Hayemsche Lösung von der oben genannten Konzentration die Konturen der Zellen.

1. Durchm.	in NaCllösung;	in Hayemscher Flüssigkeit.
aa.	0,1497 mm.	0,1248 mm.
bb.	0,1497 „	0,1256 „
cc.	0,1489 „	0,1248 „
dd.	0,1518 „	0,1248 „
Summa	= 0,6001.	0,5000.

Mittlerer Durchm. = 0,15002 mm. 0,125 mm.
Vol. in NaCllösung = 0,0017679 ccmm.
Vol. in Hayemsch. Flüss. = 0,0010226 „
Differenz = 0,0007453 ccmm.

2. Durchm.	in NaCllösung;	in Hayemsch. Flüss.
aa.	0.1240 mm.	0,1206 mm.
bb.	0,1256 „	0,1206 „
cc.	0,1248 „	0,1198 „
dd.	0,1248 „	0,1206 „
Summa	= 0,4992.	0,4816.

Mittlerer Durchm. = 0,1248 mm. 0,1204 mm.
Vol. in NaCllösung = 0,0010177 ccmm.
Vol. in Hayemsch. Flüss. = 0,0009139 „
Differenz = 0,0001038 ccmm.

Die schrumpfende Wirkung des Sublimats beruht auf der Koagulierung des Eiweisses. Damit hängt auch der Umstand zusammen, dass das innere Strukturbild durch die Anwendung des Sublimats von dem frischer Objekte total verschieden ist. Man sieht eigentlich nur noch einen gleichmässigen Niederschlag, ohne Einzelheiten an dem Bilde unterscheiden zu können.

Beim Alkohol kommt neben der Koagulation des Eiweisses noch die wasserentziehende Wirkung in Betracht. Ich wandte Alkohol in absoluter Form an.

1. Durchm.	in NaCllösung:	in Alkohol absol.
aa.	0,1406 mm	0,1081 mm
bb.	0,1373 „	0,1007 „
cc.	0,1373 „	0,1165 „
dd.	0,1373 „	0,0957 „

2. Durchm.	in NaCllösung:	in Alkohol absol.
aa.	0,1433 mm	0,1296 mm
bb.	0,1516 „	0,1254 „
cc.	0,1453 „	0,1337 „
dd.	0,1453 „	0,1171 „

Die Schrumpfung in absolutem Alkohol ist eine so unregelmässige, dass ich von der Berechnung des mittleren Durchmessers und des Volumens absehe. Wird der Alkohol auf bereits vorher fixierte Objekte angewandt, dann findet zwar eine nicht viel geringere Schrumpfung statt, aber die Konturen bleiben viel besser erhalten.

Durchm.	in Flemming. Lös.:	in Alkohol absol.
aa.	0,183 mm	0,1714 mm
bb.	0,1809 „	0,1664 „
cc.	0,1809 „	0,1622 „
dd.	0,183 „	0,1685 „
Summa =	0,7278	0,6685

Mittlerer Durchmesser = 0,1819 mm 0,1671 mm
Volumen in Flemmingscher Lösung = 0,0031519
Volumen in absol. Alkohol = 0,0024387
Differenz = 0,0007132

Durchm.	in Sublimat;	in Alkohol absol.
aa.	0,1447 mm	0,1248 mm
bb.	0,1457 „	0,1310 „
cc.	0,1457 „	0,1248 „
dd.	0,1457 „	0,1227 „
Summa =	0,5818	0,5033

Mittlerer Durchm. = 0,1454 mm 0,1258 mm
Volumen in Sublimat = 0,0016094 ccmm
Volumen in Alkohol abs. = 0,0010424 „
Differenz = 0.0005670 ccmm

Ich komme zuletzt zur Lugolschen Lösung. Obwohl dieses Fixationsmittel für Eizellen wohl kaum in Gebrauch ist, schien es mir doch interessant, seine Wirkung zu studieren. Diese Wirkung wird gewöhnlich auf die Koagulation des Eiweisses geschoben.

1. Durchm.	in NaCllösung;	in Lugolscher Lös.
aa.	0,1705 mm	0,1373 mm
bb.	0.1705 „	0,1331 „
cc.	0,1705 „	0,1381 „
dd.	0,1747 „	0,1373 „
Summa =	0,6857	0,5458

Mittlerer Durchm. = 0,1714 mm 0,1364 mm
Volumen in NaCllösung = 0,0026363 ccmm
Volumen in Lugolscher Lös. = 0,0013287 „
Differenz = 0,0013076 ccmm

2. Durchm. in NaCllösung;		in Lugolscher Lösung.
aa.	0,1528 mm	0,1204 mm
bb.	0,1578 „	0,1204 „
cc.	0,1578 „	0,1163 „
dd.	0,1557 „	0,1296 „
Summa =	0,6241	0,4867

Mittlerer Durchm. = 0,156 mm 0,1217 mm
Vol. in NaCllösung = 0,0019877 ccmm
Vol. in Lugolscher Lös. = 0,0009414 ccmm
Differenz = 0,0010463 ccmm

Wenn ich die gesamten Resultate übersehe, so ist es allerdings nur eine Reihe empirisch gewonnener Thatsachen, die ich zu geben imstande bin. Aber ich betrachte eben auch meine Ergebnisse nur als einen Anfang zu weiteren Untersuchungen auf diesem bis jetzt noch so vernachlässigtem Gebiete. Ich möchte zudem vor der Einseitigkeit warnen, die verschiedenen Grössenveränderungen verschiedener histologischer Objekte durch die betreffenden Zusatzflüssigkeiten einzig und allein auf chemische Differenzen zu beziehen, sondern ich betrachte die abweichende Einwirkungsweise als Komponente vieler wichtiger Faktoren, welche allerdings bis jetzt noch zum grossen Teil unserem Einblicke verschlossen sind. So kommt beispielsweise bei der Wirkung der Reagentien auf rote Blutkörperchen und Eizellen neben den allerdings sehr grossen Differenzen chemischer Natur unter anderem auch der Umstand in Betracht, dass die roten Blutkörperchen mit einer zu ihrem Inhalte relativ sehr grossen Oberfläche dem betreffenden Reagenz ausgesetzt sind, mit einer relativ kleinen die Eizellen, wodurch notwendigerweise der zeitliche Gang der Einwirkung, vielleicht auch das Gesamtergebniss beeinflusst wird. Ueberhaupt ist die körperliche Betrachtung wohl geeignet, noch manchen Aufschluss über die Form und Struktur der histologischen Objekte zu geben. Eine Eizelle als eine fast völlige Kugel hat bei geringster Oberfläche den möglichst grössten Inhalt, eine Leberzelle beispielsweise eine im Vergleiche mit ihrem Inhalt relativ viel grössere Oberfläche. Und da wir gewohnt sind, in allen solchen

Erscheinungen ein Gesetz zu sehen, und die teleologische Betrachtung einen wichtigen Faktor in der naturwissenschaftlichen Beobachtungsweise darstellt, so dürften auch solche Erfahrungen eine gerechte Würdigung beanspruchen. Und so komme ich denn zum Schluss auf eine Betrachtung zurück, mit der ich meine Abhandlung eingeleitet habe, dass nur eine möglichst ausgiebige Anwendung aller zu Gebote stehenden Mittel, der Chemie, Physik, Mathematik, kurz aller exakten Naturwissenschaften, imstande ist, unser Wissen über die Organisation der Körperbestandteile, Zellen und intercellularen Teile, zu fördern und zu erweitern. —

Thesen.

I.

Den roten Blutkörperchen der Frösche und Tauben kommt eine membranöse Hülle zu. Auch bei Kaninchenblutkörperchen lässt sich durch Einwirkung bestimmter Reagentien eine differenzierte Rindensubstanz unterscheiden, sodass auch hier die Annahme einer besonderen Kortikalschicht gerechtfertigt erscheint.

II.

Eine indifferente künstliche Zusatzflüssigkeit für Eizellen existiert nicht.

III.

Die Versuche, die Werlhofsche Blutfleckenkrankheit als einheitliche Infektionskrankheit hinzustellen, scheinen mir einer sicheren Grundlage zu entbehren.

Lebenslauf.

Ich bin am 5. September 1870 in Schloppe, Provinz Westpreussen geboren, jüdischer Konfession. Das Gymnasium absolvierte ich in Dramburg, nachdem ich vorher das Landsberger Gymnasium besucht hatte. Die Universität bezog ich Ostern 1889 in Berlin, wo ich mich bei der medizinischen Fakultät inskribieren liess. Ostern 1891 bestand ich das Tentamen physicum, das Tentamen medicum am 4. März 1893 und am 10. März das Examen rigorosum.

Im Laufe meiner Studien hörte ich die Vorlesungen der Herren Professoren und Docenten: B. Baginsky, v. Bardeleben, Behrend, E. du Bois-Reymond, C. du Bois-Reymond, Dührssen, Gerhardt, Gusserow, Hartmann, v. Hofmann (†), Israel, Kundt, Langgaard, Liebreich, Rosenheim, Senator, Silex, Sonnenburg, R. Virchow, Waldeyer, Wolff, Zuelzer.

Allen diesen Herren spreche ich meinen aufrichtigen Dank aus.